

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-159287

(43)Date of publication of application : 04.06.2002

(51)Int. CI.

C12M 1/34
 C12M 1/02
 C12M 1/26
 C12N 5/06
 G01N 33/48
 G01N 33/483
 // C12Q 1/06

(21)Application number : 2001-226466 (71)Applicant : EFFECTOR CELL INSTITUTE INC

(22)Date of filing : 26.07.2001 (72)Inventor : KANEGASAKI SHIRO
 KIKUCHI YUJI
 KIKUCHI HIROKO

(30)Priority

Priority number : 2000276280

Priority date : 12.09.2000

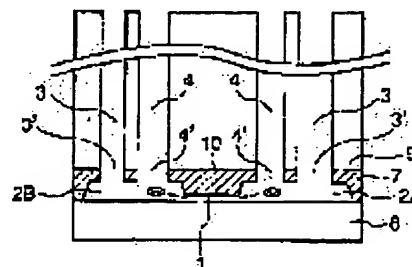
Priority country : JP

(54) APPARATUS FOR DETECTING CHEMOTAXIS OF CELL AND FOR ISOLATING CHAMOTACTIC CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an apparatus that permits accurately and easily detecting the chemotaxis of a cell by a chemotactic factor or the inhibition of chemotaxis of a cell by an inhibitor to chemotaxis by accurately and easily detecting the movement of a cell for itself using a small amount of specimen and for isolating such a cell.

SOLUTION: This apparatus for detecting the chemotaxis of a cell and for isolating a chemotactic cell is an apparatus having wells connected one another via paths, wherein each path has a tube for injecting or collecting a specimen and a tube for avoiding the elevation or reduction of the pressure caused by the injection or collection of the specimen.



- 1: 底座
 2: 井
 3: 材料注入・採取用管
 4: 管2に対応する透過孔
 5: 材料の注入・採取時における弁閉・減圧を回避するための管
 6: 管4に対応する透過孔
 7: 蓋板
 8: 1799 基板
 9: 管を穿けた部分
 10: 上蓋

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision]

BEST AVAILABLE COPY

of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998, 2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-159287

(P2002-159287A)

(43) 公開日 平成14年6月4日(2002.6.4)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	特許庁(参考)
C12M 1/34		C12M 1/34	B 2G045
	1/02		A 4B029
	1/28		4B063
C12N 5/06		G01N 33/48	M 4B065
G01N 33/48			S

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-226466(P2001-226466)

(22) 出願日 平成13年7月26日(2001.7.26)

(31) 優先権主張番号 特願2000-276280(P2000-276280)

(32) 優先日 平成12年9月12日(2000.9.12)

(33) 優先権主張国 日本(JP)

(71) 出願人 500201406

株式会社 エフェクター細胞研究所
東京都目黒区駒場4-6-2メゾン駒場
401号

(72) 発明者 金ヶ▲崎▼ 士朗

神奈川県川崎市多摩区荏形1丁目21-2-503

(72) 発明者 菊池 佑二

茨城県竜ヶ崎市長保台4丁目1-10-2-506

(74) 代理人 100082739

弁理士 成瀬 勝夫 (外1名)

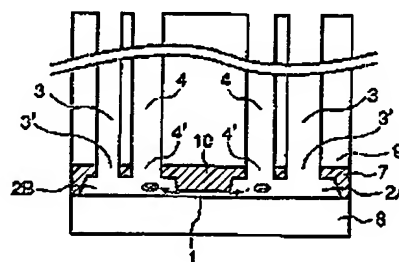
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞走化性検出及び走化細胞分離装置

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、走化性因子による細胞の走化性又は走化性因子阻害剤による細胞の走化性阻害を検出するに当たり、少量の細胞試料を用いて、細胞の自力に基づく動きを正確にしかも容易に検出する装置を提供すると共に、細胞を分離する装置を提供することを目的とする。

【解決手段】 複数のウェルが互いに流路を介して連通していること及び各ウェルが試料を注入又は採取するための管と試料の注入又は採取による昇圧又は減圧を回避するための管とを備えていることを特徴とする細胞走化性検出及び細胞分離装置。



- 1: 流路
2: 基板
3: 試料注入・採取用管
3': 管3に対応する貫通孔
4: 試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管
4': 管4に対応する貫通孔
7: 膜板
8: 基板
9: 試料の注入・採取用管
10: 試料

(2)

特開2002-159287

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数のウェルが互いに流路を介して連通していること及び各ウェルが試料を注入又は採取するための管と試料の注入又は採取による昇圧又は減圧を回避するための管とを備えていることを特徴とする細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項2】 複数のウェルが流路を介して直列に連通していることを特徴とする請求項1記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項3】 1つのウェルに複数のウェルが流路を介して連通していることを特徴とする請求項1記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項4】 1つのウェルに流路を介して連通している複数のウェルの内、少なくとも2つのウェルが流路を介して更に他の共通のウェルと連通していることを特徴とする請求項3記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項5】 流路を介して互いに連通しているウェルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることを特徴とする請求項1乃至4記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項6】 流路が、狭い隙間を形成する土手であり、必要に応じてテラスを有することを特徴とする請求項1記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項7】 流路において、土手に細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本構成する階壁が設けられていることを特徴とする請求項6記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項8】 流路において、相対するウェルに向かう方向の複数の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していることを特徴とする請求項7記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項9】 流路において、相対するウェルに向かう方向の複数の溝の幅が、これに直交する1乃至複数の溝を横切る度に段階的に変化することを特徴とする請求項8記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項10】 流路において、相対するウェルに向かう方向の複数の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていることを特徴とする請求項8又は9記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項11】 流路において、土手の中央にテラスを設け、テラスをばさんで溝を構成する階壁の列が2箇所に形成されていることを特徴とする請求項7乃至10記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項12】 流路に設けられた土手のテラスが多段に形成されていることを特徴とする請求項6乃至11記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項13】 流路において、土手に細胞の径又はその

2

変形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本構成する階壁が設けられており、且つ、土手にテラスが多段に形成されていることを特徴とする請求項6記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項14】 請求項1乃至13記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置の夫々を1ユニットとし、同一又は複数種のユニットを複数個集積してなる集積ユニットを1又は複数個備えていることを特徴とする細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項15】 請求項1乃至13記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置よりなる単位ユニットの1個、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット又は複数個の集積ユニットよりなるユニット部、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、これ等各部を移動する細胞供給ピペット、検体供給ピペット及びユニット部における細胞の移動を検出し、必要に応じて検出結果を記録する検出部をユニット部と一体化して設けるか、または、複数のユニット部に対応可能な様に設け、且つ、細胞供給ピペット及び検体供給ピペットの移動を制御する機構及び、必要に応じ、ユニット部を検出部に移動させると共に次のユニット部をピペットの動線の位置に移動させるための機構を備えていることを特徴とする自動化された細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項16】 ピペット洗浄部を備え、ピペットがピペット洗浄部において洗浄液を吸引・排出するよう制御されることを特徴とする請求項15記載の自動化された細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項17】 細胞供給ピペットが細胞貯蔵部から予め定められた量の細胞懸濁液を、必要に応じ攪拌後、吸引し、これをユニット部に供給するよう制御されること、検体供給ピペットが検体貯蔵部から予め定められた量の検体を吸引し、これをユニット部に供給し、次いでピペット洗浄部で洗浄液を吸排して洗浄するよう制御されること、必要時に応じ、検体供給ピペットが、検体供給動作の前に、先に供給された細胞のウェル内における位置を調整するために所定量の液体を吸引するよう制御されることを特徴とする請求項16記載の自動化された細胞走化性検出及び走化細胞分離装置。

【請求項18】 請求項1乃至17記載の細胞走化性検出及び走化細胞分離装置において、一つのウェルに複数種の細胞の混合浮遊液を入れ、他のウェルに特定の細胞に対する走化性因子含有溶液を入れ、当該他のウェルに移動した細胞を採取することを特徴とする走化細胞の分離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞が自力で一定の方向に移動するか否かの判定、細胞が自力で一定の方向に移動する状態の観察、或いは一定の方向に自力で移動した細胞の数を計数するための装置、即ち、細胞走化

(3)

特開2002-159287

3

性検出装置に関わる。更に、本発明は、細胞が選択的に自力で一定の方向に移動することを利用する細胞の分離装置及びそれを用いる細胞の分離方法に関わる。

【0002】

【従来の技術】細胞の定化性をin vitroで検出する装置としてポイデンチャンバーが使用されてきた。これは、細胞が通過できる大きさの穴（直径3～8μm）があいているフィルターで上室と下室とに2分された構造を有し、上室に細胞浮遊液を、下室に定化性因子を含む検体溶液を入れ、定化性因子に向かって移動する細胞がフィルターを通過し又は裏面に現れた数を観察する装置である。今日最も普通に使用されている装置であるが、細胞浮遊液の量として、 1×10^6 cells/mlの濃度の浮遊液を1/4ml～1/20ml要する。これは、細胞数にして、少なくとも 5×10^4 個を必要とすることを意味する。多量に得られる細胞を対象とする場合はさしたる問題はないが、例えば、好酸球は抹消血白血球に占める割合が1～5%程度、好塩基球は同じく1%以下、単球は同じく1～2%程度であり、この様な少量のみ存在する細胞を対象とする場合は、必要量を手に入れるために多くの労力を要する。また、マウスのような小動物を用いる場合、採血可能な量は限られており、一頭あたりせいぜい、7ml程度である。更に、がん細胞や組織に存在する細胞にも多量には入手しにくい細胞があり、その性質を調べるには使用量が少ないことが望まれる。また、ポイデンチャンバーにおいては、移動する過程にある細胞の状態の観察や数の計数を行うことができない。

【0003】細胞の定化を数個のレベルで観察できる定化用スライドガラスが市販されている。これは、スライドガラス上に1mm幅の土手（流路）を挟んで幅4mm、長さ25mm、深さ1mmの溝が2本設けられている。一方の溝に細胞浮遊液を入れ、他方の溝に定化性因子を含む検体溶液を入れ、一方の溝から土手を越えて他方の溝へ移動する細胞を顕微鏡で観察する。この製品では、夫々の溝に細胞浮遊液や検体溶液を入れる際、液が夫々の溝から溢れて他方の溝に流れ込まないようにするために微妙な調節を要する。また、一本の溝の容積が100μlであり、少なくとも1/10mlの細胞浮遊液を要する。

【0004】スライドガラス上に、同心円状に二つのウェルを設け、その間を土手（流路）で隔てたケモタキシスチャンバーが市販されている（ウェーバーサイエンティフィック社）。これは、内側のウェルに細胞浮遊液を、外側のウェルに検体を夫々入れ、カバーガラスを被せて、マウントを通過する細胞を顕微鏡で観察するものである。土手はカバーガラスより20μm低く設定されており、細胞はその隙間を通過する。この装置を使用する場合は、各ウェルに細胞浮遊液又は検体を入れる際に、液が溢れないように微妙な調節をする必要があり、また液面が盛り上がりカバーガラスを被せたとき両ウェルの

4

液が土手を乗り越えて混ざり合うことが起こりやすい。従って、この装置では、細胞の定化・遊走を観察するのにとどまり、定化・遊走の有無や定量を行うことは難しい。

【0005】血液レオロジーの計測のために、シリコン単結晶基板表面に半導体作製技術を利用して微細な溝を複数本設けてなる流路を備えた装置が提案されている（Kikuchi 他、SPIE Vol.2978、165-171(1997)、菊池 他、生物物理 214号254-258(1997)）。これは、流路を挟んで圧力差を与えることにより血球浮遊液の流れを作り、血流の状況を観察し研究しようとするもので、細胞レベルでの挙動を観察することを可能とするものであるが、血球の自力による移動を観察乃至計測することを目的としていない。

【0006】特開平3-257366号公報には、一端部に流入口を有し、他端部に流出口を有する大きな溝を並列に配置し、且つ、この溝を区画する隔壁に、前記流入口と流出口とを結ぶ直線に對し直交する方向において、溝相互を連通する微小な溝を設けてなる血液回路が記載されている。これは、大きな溝の一つに血液試料を流し、他方の溝に定化性因子を含む検体を流しておき、血液試料の一部のみを微細な溝（流路）に導き、微細な溝（流路）を通過する細胞を検出することで、細胞の動きや機能をチェックし、或いは遊走性を観察・測定するものである。大きな溝により血液試料及び定化性因子を含む検体が循環する流れを作るため、血液試料及び検体が相当量必要であり、微量な試料を用いて細胞の性質を調べるには不向きである。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、定化性因子による細胞の定化性又は定化性因子阻害剤による細胞の定化性阻害を検出するに当たり、細胞の自力に基づく動きを正確にしかも容易に検出する装置を提供することを目的とする。ここに、自力に基づく動きとは、圧力等の影響を受けることなく、細胞が自らの運動により移動する状態を意味し、定化性因子の作用を高い信頼度で検出するために重要な事項である。そのためには、細胞浮遊液や検体溶液等の試料が、各ウェルに注入される際、相互に混ざり合わないことが必要である。また、本発明は、少量の細胞試料を用いて細胞の定化性を検出することができる装置を提供することを目的とする。加えて、本発明は、細胞の定化性物質及びそれを阻害する物質の検索を行う装置の提供を目的とする。更に、本発明は、細胞の動きを個々のレベルで捉えることができる装置の提供を目的の一つとする。本発明は、一度に多数の検体につき、検出・測定を自動的に行うことができる装置を提供することも、その目的の一つとする。本発明は、複数種の細胞の混合液から特定の細胞を選択的に分離採取する装置を提供することも、その目的の一つとする。

【0008】

(4)

特開2002-159287

5

【課題を解決するための手段】本発明に関わる装置は、複数のウェルが互いに流路を介して連通していること及び各ウェルが試料を注入又は採取するための管と試料の注入又は採取による昇圧又は減圧を回避するための管とを備えていることを特徴とする細胞走化性検出及び定化細胞分離装置である。

【0009】複数のウェルは流路を介して直列に連通していても良く、また、1つのウェルに複数のウェルが流路を介して連通していても良い。更に、後者の場合において、1つのウェルに流路を介して連通している複数のウェルの内、少なくとも2つが相互に流路を介して更に他の共通のウェルと連通していてもよい。

【0010】これ等ウェルの少なくとも一つにおいて、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることができる。

【0011】本発明において好ましい流路は、狭い隙間を形成する土手であり、土手には、細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本、例えば、約100本構成する隔壁を設けることが好ましい。流路において相対するウェルに向かう方向の複数の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していてもよく、又、相対するウェルに向かう方向の複数の溝の幅が、これに直交する溝を横切る度に段階的に変化してもよい。更に、相対するウェルに向かう方向の複数の溝の溝が、これに直交する溝を横切る度に相互の位置関係をシフトさせ、例えば2分の1ピッチずらして形成されていてもよい。

【0012】また、土手には、テラスが設けられていてもよく、テラスは多段に形成されていてもよい。土手の中央にテラスを設け、テラスを挟んで溝を構成する隔壁の列が2箇所に形成されていてもよい。

【0013】本発明の細胞走化性検出及び定化細胞分離装置は、上記の各装置を1ユニットとし、同一又は複数のユニットを複数個集積させた集積ユニットを1乃至複数個有することができる。これは、多検体を同時に処理し、多数又は多種の細胞の定化性を同時に検出し、或いは多種の細胞を一度に分離するために役立つ。

【0014】本発明は、上記細胞定化性検出及び定化細胞分離装置よりなる単位ユニットの1個、同一又は複数のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット又は複数の集積ユニットよりなるユニット部、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、これ等各部を移動する細胞供給ピペット、検体供給ピペット及びユニット部における細胞の移動を検出し、必要に応じて検出結果を記録する検出部をユニット部と一体化して設けるか、または、複数のユニット部に対応可能な様に設け、且つ、細胞供給ピペット及び検体供給ピペットの移動を制御する機構及び、必要に応じて、ユニット部を検出部に移動させると共に次のユニット部をピペットの先端の位置に移動させるための機構を備えている自動化された細胞定化性検出及び定化細胞分離装置を含む。ここで、ピペットの材質は、ガラスに限らず、金属、プラスチック等適宜適して使用できる。

【0015】更に本発明は、必要に応じ、ピペット洗浄部を備え、ピペットがピペット洗浄部において洗浄液を吸引・排出するよう制御される機構を含むことができる。

【0016】本発明は、細胞供給ピペットが細胞貯蔵部から予め定められた量の細胞懸濁液を、必要に応じ検体後、吸引し、これをユニット部に供給するよう制御されること、検体供給ピペットが検体貯蔵部から予め定められた量の検体を吸引し、これをユニット部に供給し、次いでピペット洗浄部で洗浄液を吸引して洗浄するよう制御されること、必要時に応じ、検体供給ピペットが、検体供給動作の前に、先に供給された細胞のウェル内における位置を調整するために所定量の液体を吸引するよう制御されることを含む自動化された細胞走化性検出及び定化細胞分離装置である。

【0017】本発明は、本発明に関わる細胞定化性検出及び定化細胞分離装置において、一つのウェルに複数の種の細胞の混合懸濁液を入れ、他のウェルに特定の細胞に対する定化性因子含有溶液を入れ、当該他のウェルに移動した細胞を採取することによる細胞の分離方法に関わる。

【0018】本発明の装置の形態】本発明に関わる細胞定化性検出及び定化細胞分離装置は、複数のウェルが流路を挟んで結合し、互いに連通しており、夫々のウェルには試料を注入又は採取するための管及び試料の注入又は採取による昇圧又は減圧を回避するための管の二本の管が設けられている。ここで、流路とは、二つのウェルを連通させている部分であり、一つのウェルから他方のウェルに細胞が移動するときに細胞が通過する通路である。本発明の装置は、試料を注入・採取する際、流路において相対するウェルに向かう方向の液流が生じにくく、流路の両端にあるウェルの液体が互いに混ざり合うことがなく、その結果、細胞が専ら定化性因子の作用によってのみ移動する場合を検出できる装置であって、原理を図1(断面図)及び図2(下面図)により説明すれば次の通りである。

【0019】図1及び図2において、1は流路、2は細胞懸濁液や検体溶液等の試料を収納するウェルであり、試料はマイクロピペット等により管3を通じてウェル2に供給され、或いはウェル2から採取される。ウェル2の一つ(2A)に細胞懸濁液を入れたとき、細胞は、他方のウェル(2B)の検体溶液が定化性因子である場合はウェル2Bに向かって移動しようとし、流路1を通過する。

【0020】試料の一つである細胞懸濁液を、マイクロピペット等により管3を通じてウェル2Aに供給する

(5)

特開2002-159287

7

隙、注入する液圧により細胞が流路1を通過して反対側のウエル2Bに移動してしまうことが生じる。これは、細胞の移動が検体の有する走化性によるのか否かの判定に混乱を与える要因となるとともに、細胞の分離を目的とする場合は、所望の細胞に他の細胞が混合してしまうことになり目的が達せられないことになる。この問題点を解決するために、本発明は、管3と連通するように管4を設け、管3に加わる注入圧を管4の方向に逃がし、流路1に向かって細胞が強制的に流れることを防止する。

【0021】同様に、検体溶液を、マイクロピペット等により管3を通じてウエル(2B)に供給する際、注入圧により検体溶液が流路1を通過して反対側のウエル(2A)に入り細胞浮遊液と混合する事象が生じ、細胞がその走化性により流路1を通過する現象が混乱乃至阻害される。これを防止するために、検体を収納するウエル(2B)においても管4を設ける。かくして、本発明において試料を注入する管3に連通する管4を設けることにより、水平方向への液圧の影響を最小にすることができ、検体溶液が細胞走化性を有するか否かの判定をより正確

に行うことができる。管4による圧力差の緩和作用は、ウエルから細胞などの試料を採取する際の減圧を緩和する上でも有効であり、試料の採取を容易にする。

【0022】本発明の装置においてウエルに試料を注入する場合を、図1により説明すると、予め各ウエル及び流路を細胞等浮遊液で満たしておき、ウエル2Aの管3から細胞浮遊液を、ウエル2Bの管3から走化性因子含有溶液を、夫々ばね等をつつ注入する。こうすることにより、試料注入時の圧力は管4により緩和される。

【0023】本発明の装置において、夫々のウエルが試料を注入又は採取するための管と共に試料の注入又は採取による昇圧又は減圧を回避するための管とを備えているため、他のウエルに影響を与えることなく、各ウエルに試料を注入し、或いはウエルから試料を採取することができ、このことの故に、複数のウエルを目的に応じて種々の様式で結合させ、互いに連通させることが可能である。複数のウエル2が流路1を介して結合し互いに連通する様式は、後述するように、目的に応じて種々採用しうる(図12～図15)。

【0024】細胞の走化性を検出し、或いは分離する場合、注入された細胞は、当初、ウエル内において土手或いは流路の近傍に集められることが望ましい。図1で示す細胞走化性検出又は走化細胞分離装置のユニットを例にとれば、管3を通してウエル2Aに注入された細胞は、土手の近傍、即ち、ウエル2Bに向かう流路の近傍に存在することが望ましい。この位置の調節は、流路を介して相対するウエル2Bの管3又は4から適量の液体を適当な速度で吸引することにより行うことができる。吸引する液体の量は、管及びウエルの容積から求められる。吸引する液体の量及び吸引速度はコンピュータープログ

8

ラムにより容易に制御することができる。

【0025】流路1には、図4乃至11に示すような、細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝を1乃至複数本、例えば、約100本構成する障壁を設けることが好ましい。ここに、細胞の変形能とは、細胞が弾力性を有するものであるとき、その弾力性のために容易に形を変え、扁平状やひも状などの形態をとり、通常、細胞が自由空間でとる形状(球状)において有する径よりも狭い間隔の溝を通り抜けることを言う。かかる溝を設けることにより、細胞を個々のレベルで観察することが可能となり、又、細胞を所望の種類ごとに分離することができる。なお、図3は、流路1において図4～図11に例示されるような溝5を構成するべく、障壁6が設けられている場合を示す。

【0026】細胞の移動の観察乃至流路を通過中又は通過後の細胞数の計数は、図3に示すように流路1に検知装置、例えば顕微鏡をセットすることにより行われる。また、顕微鏡-ビデオカメラ、或いはCCDカメラを組み合わせることで、自動的に細胞の移動する経過を記録することが可能となる。

【0027】流路1を通過する細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡で捉えることにより行うこともできるが、常法に従い、予め細胞を発光・蛍光物質でマーキングしておき、その発光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

【0028】上述した、連通管を備えたウエルが流路を介して連通してなる装置を1ユニットとし、複数のユニットを集積させることにより、多種類の検体又は多種類の細胞を対象として、同時に検出を行うことができる装置とすることができる。検体溶液を注入するための管及び細胞浮遊液を注入・採取するための管が、夫々直線上又は同心円上に並ぶように各ユニットを集積させることにより、複数のマイクロピペットによる作業を容易とし、又、夫々の流路を通過する細胞を同時並行して観察することが可能となる(図17～図21、図25参照)。細胞の分離に当たっても、一度に多数の試料を処理することができる。

【0029】本発明によれば、かかる装置の全体を小型化することが可能であり、試料の処理を微量で行うことができ、しかも各ユニットを多数集積させて、多数検体の処理を同時に行うことが可能となる。更に、液体の吸引・注入量のプログラム制御により自動化して行うことが容易である。

【0030】即ち、装置の自動化は、ユニット単体、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット又は複数の集積ユニットよりなるユニット部と共に、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、必要に応じてピペット洗浄部及びこれ等各部を移動する細胞や検体等の試料供給ピペットを備え、且つ、これ等ピペットの作動を制御する機構を備えることにより、細胞や検体等の供給・採

9

取も含めた装置全体を自動制御することができる。この制御は、コンピュータプログラムにより容易に行われる。

【0031】本発明に関わる装置の構造を更に具体的に説明すれば、次の通りである。

【0032】1) ユニットの構造

図1及び図2に例示するように、流路1及びウエル2は基板7上に一体的に構築され、基板7には各ウエルに通じる二本の管と連絡する穴(貫通孔)3'、4'が設けられる。基板7の貫通孔3'、4'に相当する管3、4を穿ったブロック9が、各管が基板7上の各貫通孔3'、4'に合致するように固着される。基板7の下面には光学研磨したガラス基板8を圧着させる。なお、ブロック9、基板7及びガラス基板8はOリングで締め付ける等により圧着・固定してもよい(図22参照)。

【0033】2) ウエル

ウエル2は、試料、即ち、細胞懸液又は消化性因子含有溶液、同阻害割合含有溶液等の検体溶液を収納するもので、容積は、特に制限は無く、必要最小限の液量を収納できればよい。例えば、深さ0.1mm程度、幅1.2mm程度、長さ2.5mm程度あれば充分である。

【0034】流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方、例えば細胞を収納するウエル、又は双方において、流路の近傍における液体又は細胞懸液の量を制限するべく、流路に直交して壁を設けることにより、ウエル内における細胞の流路に対する位置関係を調整することが容易となり、或いは、検体試料の流れを調整することが容易となる(図23)。図23は、流路1を介してウエル2A、2Bが連通しており、夫々のウエルに、流路1に直交して壁14A及び14Bが設けられている場合を示す。試料注入管3Aからウエル2Aに細胞が注入されたとき、細胞は壁14Aと流路1の間に集まり易い。壁14と流路1との間隔は任意に設定できるが、通常は50~300μmから選ばれる。

【0035】図24は、流路に直交して壁を設けたウエルと流路の変形例を示しており、(1)はウエルの幅の一部に流路が設けられている場合を、(2)は流路が中央で二分されており、流路を挟んで一個のウエル(2A)に対し二個のウエル(2B、2C)が設けられていると共にウエル2A側のみ壁24が設けられている場合を、(3)は流路において隔壁の列がテラス11を挟んで二列設けられている場合を、夫々示している。このような変形は例示として挙げたもので、これ等に限られないことは言うまでもない。

【0036】3) 流路

流路1の構造の一例を図1、図3により説明すれば次の通りである。流路1は、両端のウエル2Aとウエル2Bを隔てる土手10(基板7上の突出部)及びガラス基板8により構成される。好ましい態様としては、土手の上

(6)

特開2002-159287

10

られ、細胞が通過する溝5が形成される。

【0037】土手10は、流路1の両端にあるウエル2を隔てるもので、そのサイズは、特に限定されるものではないが、例えば、高さ0.1mm程度、相対するウエルに向かう方向における長さとして0.01~1.0mm程度、相対するウエルに向かう方向に直交する方向における長さとして1.2mm程度あればよい。

【0038】土手の上面に、隔壁を挟んで、平面を設けると細胞の通過が観察しやすくなる(この平面をテラスと呼ぶことにする)。テラス11(図3)は、必須のものではないが、設けることが好ましい。テラス11を設ける場合、その相対するウエルに向かう方向の長さは約0.03mm乃至約0.4mmから適宜選ばれる。

【0039】なお、図26に例示するように、テラス11を多段式に形成することにより、一方のウエル側から吸引すると他方のウエルに入れた細胞が土手10の近傍に集まり易くなる。例えば、細胞が好中球、好酸球、好塩基球等である場合、テラス11、及び11'のガラス基板8からの距離(図においては隔壁6の高さ)を3μm、テラス11、及び11'のガラス基板8からの距離を4.5μmとし、ウエル2Aに細胞を入れ、ウエル2Bの側から液を吸引すると、細胞はテラス11、のところで一旦止まった後、テラス11、とガラス基板8との間に集まり易くなる。各テラス11、のガラス基板8からの距離は、取扱う細胞に応じて適宜設定することができ、概ね3乃至5μmの範囲で設定され得るが、これに限定されるわけではない。ここで、細胞を収納するウエルの反対側のテラス(11')の長さを、細胞を収納するウエルの側のテラス(テラス11、)より約1.5乃至5倍長くすると、溝5を通り抜けた細胞の観察や計数をより容易に行うことができる。なお、図26は隔壁6が設けられている場合を示しているが、テラス11、及び11'のガラス基板8からの距離が細胞の径又は変形能に相当する場合は、隔壁は必ずしも必要ではない。

【0040】土手の上面に隔壁6(図3~5参照)を設ける場合、隔壁6により構成される溝5の断面は、V字型断面、凹型断面、半円型断面等、任意の形状とすることができるが、通常はV字型断面が好ましい。溝5の幅は、通常3~50μmから選ばれ、対象とする細胞が1個ずつ通過するだけの幅であることが好ましく、細胞の種類に合わせて好適な幅が選ばれる。赤血球、好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T細胞、B細胞等の場合は3~10μm、例えば6、7、8又は10μmから選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は10~20μmの幅が選ばれる。溝5の数は1乃至約100本、好ましくは約5乃至約80本、より好ましくは約10乃至約50本である。

【0041】隔壁6の長さは、約10~約400μmから選ばれ、例えば、10、20、30、40、60、100、200、300又は400μmのものが用いられる。隔壁6自体の幅は適宜

(7)

特開2002-159287

11

選ぶことができ、通常は溝5の幅の2倍程度が好ましい。図10に示す構造を採る場合は縦横の長さがほぼ等しい方が効果的である。

【0042】流路1を形成する溝5は、図6～図10に例示することく、相対するウエルに向かう方向に直交する1乃至複数本の溝12で互いに連通していてもよい。かくすることにより細胞が通過する様子をより正確に把握することができる。その場合、図8、図9の如く溝5の幅を、相対するウエルに向かう方向でこれに直交する溝12を横切る度に段階的に変化させても良い。なお、図8では、隔壁6自体の幅が変化する例を示しているが、図9に示すように、同一の大きさを有する隔壁6の数を増減させることにより溝5の幅を変化させることもできる。

【0043】図10に例示する如く、相対するウエルに向かう方向の複数の溝5が、これに直交する溝12を横切る度に、相互の位置関係をシフトさせて形成されていてもよい。図10は、相対するウエルに向かう方向の溝5が、それと直交する溝12を横切る毎に、5aと5bのように、2分の1ピッチづつ位置関係を変えて形成されている場合を示す。溝5をこのように形成させることにより、定化性因子や阻害物質を含有する検体溶液の拡散を行わせることができ、相対する流路に向かう方向での検体溶液を均一に分布させることができると共に、細胞や検体の注入・採取による昇圧・減圧をより効率よく回復することが可能となる。

【0044】更に、隔壁6は、図11に例示する如く相対するウエルに向かう方向に繋がった連続形であっても良い。また、土手の中央にテラスを設け、テラスをばさんで隔壁の列を2箇所に形成することもでき(図24(3)、図35参照)、かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞の観察・計数が容易に行われる。なお、中央のテラスの大きさは、顕微鏡の視野でカバーできる大きさであることが望ましい。図35において、(1)は上面図、(2)は断面図である。

【0045】隔壁6の高さ(溝の深さ)は、細胞の移動を観察する際の顕微鏡の焦点深度内に収まる深さであると便利であり、例えば、10～40倍の顕微鏡の焦点深度に合わせると4.5μm程度が好ましいが、これに限定される必要はない。

【0046】4) 流路を介したウエルの連通様式
流路を介したウエルの連通様式は、図1、図2に例示する2連式、図12に例示する3連式等が考えられるが、必要に応じて更に結合させ、連通させることもできる。連通の形式として、図12のような直列型の他に、図13に例示するように、一つのウエルの周りに流路を介して複数のウエルを連通させた、所謂、同心状の形式をとることもできる。図13のタイプの変形として、図14の如く、同心円状にすることもできる。図14は、3連式を同心円状にした例であり、図15は断面図である。

【0047】図13の場合、基板の貫通孔3'に管3が設

12

けられており、貫通孔4'には管4が設けられる。ウエル2Aに管3を通して細胞浮遊液を入れ、ウエル2B、～に種々の検体を入れることにより、複数の定化性因子の検索を同時に行うことができる。更に、複数の細胞を含む試料をウエル2Aに入れることにより、細胞を種類別に分離することを一度に行うことができる(ソーティング)。例えば、ウエル2B、～に細胞の種類に対応した定化性因子を入れ、中央のウエル2Aに複数の細胞を含む試料、例えば全血を入れる。細胞は、夫々の定化性因子のある各ウエル2B、～に向かって移動する。一定時間経過後に、各ウエル2B、～から、貫通孔3'に接続している管3を通して細胞を採取する。この際、ウエル2B、～の貫通孔4'に接続している管4の作用により、吸引時に発生する減圧でウエル2Aの細胞浮遊液がウエル2B、～に流入することが一時的に防止される。

【0048】図12で例示される3連式の場合は、ウエル2Aに細胞浮遊液、ウエル2Bに阻害剤含有液、ウエル2Cに定化性因子含有液を入れることにより、複数の検体につき3者の関係を一度に調べることができる。

【0049】図16には、1つのウエル(2A)に流路を介して連通している複数のウエルの内、少なくとも2つのウエル(2B₁及び2B₂)が相互に流路を介して更に他の共通のウエル(2C)と連通しているタイプが例示されている。この場合、ウエル2Aに細胞浮遊液を、ウエル2Cに定化性因子を含有する検体溶液を入れ、ウエル2B₁及び2B₂に夫々異なる阻害剤を含む検体溶液を入れることにより、夫々の阻害剤の性質を同一条件下で比較しながら調べることができる。

【0050】5) ウエルと流路の作製
基板7の材質としては、微細加工が容易で、細胞に対し比較的不活性なシリコン単結晶が好ましい。流路1の隔壁6及び溝5は、このシリコン単結晶に集積回路の製作で用いられるエッチングやフォトリソグラフィ等により工作される。ウエル2及び貫通孔3'、4'は隔壁6や溝5に比べれば比較的大きいので様々な既知の工作技術を適用して作製することができる。シリコン単結晶以外にも、硬質ガラス、硬質プラスチック、金属等も流路における微細な構造が構築可能であれば使用できる。なお、流路1とウエル2を夫々別々に作製し、組合わせてもよい。

【0051】製作過程の一例を図27により説明すると、まず、シリコン単結晶基板の一部(1)に、(2)及び(3)に示す如く、溝5を形成させる。ここで、(2)は上面図であり、(3)は酸蝕部における断面図である。次いで、溝5及び隔壁6を残して全体を隔壁の高さ(例えば、4.5μm)だけ掘り下げる(4)。その後、中央に土手10を残して、更に掘り下げてウエル2を形成させ(5)、最後に、サンドブラスト法等により、ウエルの底部に貫通孔3'、4'を設ける(6)。(7)

(8)

特開2002-159287

13

は、(6)の上面図である。

【0052】6)ブロック及び管

ブロック9は図1に例示するように、ウエルに通じる管を有する部分である。物理的に可能であれば、ウエルの貫通孔3'、4'に管を直接装着してもよく、その場合は、ブロックは必要でない。管3、4の断面は、適宜は四角形又は円形から選ばれる。管の太さは、特に限定されるものではないが、四角形の場合は1辺が1mm程度でよく、円形の場合は直径が1mm程度でよい。長さ

は、細胞浮遊液、換体溶液の容積を保持する上から、2mm〜10mm程度は必要である。

【0053】ブロック又は管を構成する材質は、ガラス、アクリル等のプラスチック又は金属から選ぶことができ、管は、適宜の工作手段、例えば、レーザー光線による穿孔その他により容易に作製される。

【0054】各ユニットに手作業(マニュアル)で、細胞又は換体を注入する場合において、作業を容易にするために、夫々の注入管の上端部の周りを、注入管の径よりも大きくロート状に盛り上げておくと、ピペットの挿入が容易となる(図28(1)及び(2)における29参照)。

【0055】7)ガラス基板

ガラス基板8は、図1に例示するように、基板7に圧着して液体を収納する空間を構成し、且つ流路を通過する細胞の観察を可能とするもので、光学的に透明且つ平面性を保持しするものである。また、細胞が接着することが望ましい。かかる目的に資するものであれば、ガラス以外にも、透明アクリル等のプラスチックも使用できる。厚さは、特に限定されるものではないが、1〜2mmあれば充分である。

【0056】8)多数のユニットの配列

流路を介して連通した複数のウエルを1ユニットとして、複数のユニットを1枚の基板上に配置乃至集積して多数換体を同時に処理する装置とすることができる。同じタイプのユニットを並列に配置する場合(例えば図17〜18)、円形に集積する場合(例えば図20〜21)、異種のユニットを配列する場合(例えば図19)など、必要に応じて種々の配置乃至集積をすることが可能である。以下に各国に基づいて配置乃至集積の様式を説明するが、もとよりこれ等は例示であり、これ等に限定されるものではなく、目的に応じて種々の組み合わせを採ることができる。

【0057】図17及び図18は、図1、図2に示す、2つのウエルが流路を介して連通してなるユニットが、1辺が16mmの正方形である一枚の基板7上に12個設けられた場合を示す。1ユニットの大きさは長辺が5.7mm、短辺が1.2mm、ユニットの間隔は0.8mmで配置されている。なお、図17では、基板7に設けられた貫通孔3'及び4'が四角形であるのに対し、図18は貫通孔が円形である場合を示す。

【0058】図19は、図16や図17に示される多数ユニッ

14

トの集積を更に集積させた場合を示す。即ち、図19においてA₁〜、B₁〜、C₁〜で表される四辺形の夫々が図17又は図18で示される集積である。ここで、A行、B行及びC行は互いに異なったタイプのユニットの集積であることができる。

【0059】図20は、2連式の独立したユニットが円形に集積されている場合を示す。図21はその断面図である。大きさを例示すると、ウエル2A及び2Bは半径方向の幅が1.5mm、流路の幅は0.5mmであり、10μm幅の溝5が設けられている。この場合、ユニット全体としての円の半径は5.0mmである。目的に応じて、大きさを変えられることは言うまでもない。

【0060】これら、多数のユニットを集積させる場合において、ブロック9は全てのユニットに夫々管を接続する1個のものとして構成することができ、ガラス基板8も全体で1枚とすることができる。

【0061】図22は、図23に示すタイプのユニットが12個集積配置された場合を示す。

【0062】図23は、多数ユニットを集積させた細胞分化性検出及び走化細胞分能装置を組立てる場合の一例を示す。カバーキャップ17と中間支持体21の間に多数ユニットを集積させた基板7、バックグランド16とそれをカバーする1個のブロック9をおき、中間支持体21と底支持体23の間に1枚のガラス基板8をおき、ネジで締め付ける。ブロック9と基板7との位置関係は中間支持体21で規定され、中間支持体21に設けられたガイドピン20とブロック9の底面に設けられたガイドピン受孔19によって固定される。なお、基板5ブロック9とは直接圧着させてもよい。

【0063】なお、図22において、1対のウエルと流路を設けた基板7を用い、全体を組み立てたユニットを、一定の間隔で複数個配置することも可能である。この場合、ユニット毎に逐次交換することができる。

【0064】8)自動制御機構

本発明の装置を自動化する場合について具体例を挙げて説明すれば次の通りである。なお、これは例示であり、自動化という目的を達成するために、種々の態様を採用し得ることは言うまでもない。

【0065】本発明に関わる細胞分化性検出及び走化細胞分能装置の自動制御機構の例を図24に示す。図24において、Uはユニット部、Cは細胞貯蔵部、Sは換体貯蔵部、Wはピペット洗浄部を示す。直線X-X'は、並列に配置された複数個(図では6個)の換体供給ピペットの動線の例を示し、直線Y-Y'は、並列に配置された複数個(図では6個)の細胞供給ピペットの動線の例を示す。ユニット部Uはピペットの動線位置にセットされている。細胞貯蔵部Cには、細胞が収納されており、換体貯蔵部Sには各種の換体が収納されている。各ピペットの動きの一例を説明すれば以下の如きであるが、これに限られないことは言うまでもない。なお、ピペットの材

15

質は、ガラスに限らず、金属、プラスチック等適宜選んで使用できる。

【0066】図29において、細胞供給ピペットが細胞貯蔵部Cから所定量の細胞懸濁液を吸引し、動線Y-Y'上をユニット部Uまで移動し、各ユニットのウエル2Aに細胞注入管3Aを通して細胞懸濁液を供給する。その後、細胞供給ピペットはCの位置に戻り、作動を停止するか、後続のユニットに細胞懸濁液を供給するために移動する。なお、細胞は重力下で沈殿するので、細胞供給ピペットの排出吸入動作を利用し、細胞を吸引採取する直前に、細胞貯蔵容器25内の細胞懸濁液を攪拌することが好ましい。

【0067】次に、検体供給ピペットが検体貯蔵部Sから所定量の検体を吸引し、動線X-X'上をUまで移動し、検体注入管3Bを通して検体を供給する。その後、検体供給ピペットは動線X-X'上をWのピペット洗浄部まで移動し、洗浄槽の洗浄液を反復吸排してピペットを洗浄する。その後、ピペットは洗浄槽の液面上まで上昇し、作動を停止するか、後続のユニット上に検体を供給するために移動する。

【0068】なお、検体供給ピペットは、検体供給動作の前に、図29のウエル2B側から所定量の液体を吸引し、ウエル2Aに入れている細胞を土手の近傍に集める動作を行わせることが好ましい。

【0069】かくして細胞懸濁液及び検体が供給されたユニット部Uは図29の矢印⇒の方向に移動し、流路1が検出部に合致する位置で停止し、細胞の状態が検出・記録される。ユニット部Uの移動により、次のユニット部Uの列がピペットの動線位置にまで移動し、上記の一連の作動が繰り返される。なお、ユニット部Uを検体貯蔵部Sと一緒に移動させることもでき、その場合は、ユニット部U及び検体貯蔵部Sの移動により、次のユニット部U及び検体貯蔵部Sの列がピペットの動線位置にまで移動することになる。

【0070】細胞貯蔵部Cは、ユニット部Uに供給される細胞を、一時的に収容するための容器であり、その機能を有すれば容器は如何なる形状でも良い。図30は、細胞貯蔵部Cの形体の一例を示すもので、ユニット部Uにおける各ユニットの配置及び複数の細胞供給ピペットに対応して複数の細胞貯蔵容器25が配置され、各容器への細胞の注入を容易にし、細胞を無駄なく使用するための注入管26が斜面の形で設けられている。更に、各容器には細胞懸濁液が無駄なく、且つ、容器内に入り易くするための導入部27を設けることが好ましい。このような構造を採用することにより、細胞懸濁液を細胞貯蔵部Cの任意の箇所まで注入すれば、全ての容器に細胞懸濁液が供給されるため、夫々の容器に注入する手間を省くことができる。また、容器から細胞懸濁液を取り出した際、残留する量を少なくするために、容器の底部を細く絞ることが望ましい。図30において、(1)は斜視図、(2)

(9)

特開2002-159287

16

は上面図、(3)は図(2)の破線A-A'における断面図であり、(4)は図(2)の破線B-B'における断面図である。

【0071】検体貯蔵部Sは、ユニット部Uに供給される検体を、一時的に収容するための容器を備えており、その機能を有すれば容器は如何なる形状でも良い。多種類の検体がユニット部に供給される場合は、各検体をマイクロピペット等を用いた手作業により検体貯蔵部の容器に注入することが多いが、その場合、手作業による注入を容易にするために、図31に例示するように、容器よりも大きな開口部を有する注入口を設けることが好ましい。また、容器から検体試料を取り出した際、残留する量を少なくするために、容器の底部を細く絞ることが望ましい(図31参照)。図31において、(1)は斜視図、(2)は断面図、(3)は上面図である。なお、図(2)には、マニュアル操作により検体を注入する際に、ピペットの先端部15が注入口から容器の内部にまで挿入される状態を示してある。図32には、複数の検体貯蔵容器が、検体供給ピペットの動線X-X'に沿って配列された場合を示す。図の如く、注入口が交互に反対側になる様に配置すれば、容器の間隔をユニット部Uにおけるユニットの間隔に合わせることができる。なお、検体貯蔵容器は角型であってもよく、その例を図33に示し、図33(2)には複数の検体貯蔵容器が、検体供給ピペットの動線X-X'に沿って配列された場合を示す。

【0072】本発明の装置において使用されるピペットは、移動及び液体の吸引・排出がコンピュータプログラムで制御されるもので、図34に例示するような、マルチチャネルシリンジを有するタイプのものが好ましい。ピペットのニードル(先端部)は、ガラス、金属、プラスチック等から作られるが、柔軟性を有する材質で製作されたものが好ましい。(1)は上面図、(2)は横断面図である。

【0073】9) 検出手段

本発明において用いられる検出手段は、流路を移動する細胞又は移動した後の細胞を検出する手段であり、必要に応じて検出結果を記録するための手段を含む。細胞を検出・記録するために知られている手段であれば何れも使用可能であり、例えば、顕微鏡、顕微鏡とビデオカメラの組合せ等である。対物レンズにCCDカメラを取り付けた構造を採用することもできる。集積ユニットの検出においては、対物レンズが各ユニットの流路を順次スキャンする構造を採用することが好ましい。

【0074】検出手段は、通常は、図3に示すように、ユニットの流路に設定されるが、多数ユニットを集積させた自動装置においては、所定の位置に設置された検出部に各ユニットの列が順次移動し、検出・記録を行う構造を採用することもできる。検出は、直線上に並んでいる各ユニットの流路を検出器がスキャンすることにより行われる。スキャンする検出器は1個でも良いし、複数個で

10

20

30

40

50

(10)

特開2002-159287

17

もよい。かくすることにより、比較的小さい数の検出装置で多数の集積ユニットに対応することが可能となる。

【0075】流路を通過中、または、通過後の細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡で捉えることにより行うこともできるが、常法に従い、予め細胞を蛍光・蛍光物質でマーキングしておき、その蛍光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

【0076】

【発明の効果】本発明の装置によれば、ウエル2の夫々に二本の管及び4を設けたことにより、試料注入時に水平方向の圧力の変化（昇圧）が生じにくいため、外圧による検体や細胞の移動が起こりにくく、細胞の自力による運動を正確に捉えることができ、走化性因子又は阻害剤の作用と細胞の性質を忠実に反映させた定置及び定性結果を得ることができる。

【0077】本発明の装置は、試料の注入に際し微妙な調節を要しないことから、装置の試料を取り扱うことに適している。即ち、使用する細胞の量を、従来使用されてきたボイデンチャンパーに比べ、10分の1乃至1000分の1とすることが可能である。例えば、試料として全血を使用したとき、好中球の走化性を検出する場合は0.1 μ lの血液でよく、好酸球、単球又は好塩基球では1 μ l程度の血液で測定可能である。

【0078】更に、液体の注入に際し、微妙な調整を要しないところから検出装置の自動化が容易に行えるというメリットがある。

【0079】複数種の細胞を含む細胞懸液から、特定の細胞のみを移動させた後、これをウエルから管を通して採取するに当たり、水平方向の圧力の変化（減圧）が生じにくいため、試料採取時の微妙な調節が不要であり、技術の熟練を要しない。その結果、目的の細胞を的確に採取することができる。

【0080】夫々のウエルに設けられた昇圧又は減圧を回避するための管は、注入液に気泡が入っていた場合、気泡を逃がす役割を果たすため、気泡を計数することが少なく、測定・観察における誤差が少ない。

【0081】本発明の装置において、流路1に細胞の径又はその変形能に合わせた幅の溝5を設けることにより、細胞の個々の動きを捉えることが可能となる。その結果、複数種の細胞を含む試料、例えば、全血を用いて、その中に含まれる種々の血球の一部について、これを予め分離することなく、走化性を調べることができ、又、複数種の細胞を含む試料から細胞を種類ごとに分離することができる。

【0082】本発明に関わる装置の単位ユニットは微小なものとすることができるため、多数のユニットを集積させることが容易であり、多数検体の同時処理が可能な装置を組み立てることができる。また、その場合、液体の注入及び検出が自動化された装置とすることが容易である。

18

【0083】多数のユニットを集積させるに当たり、異なるタイプのユニットを組み合わせることで、目的を異にする検出・分離を同時に行うことができ、処理の効率を上げることが可能となる。例えば、同一種の細胞に対して種々の走化性因子またはその阻害剤の検索を行う場合、同一の走化性因子について異なる細胞の走化性を調べる場合等においてその検索を一度に行うことが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に関わる装置の原理を示す断面図

【図2】上記の下面図

【図3】流路の構造の一例

【図4】流路の隔壁の配列例。図において、矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図5】図4の破線部における断面図。

【図6】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する1本の溝で連通している場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図7】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する2本の溝で連通している場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図8】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する2本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝の幅が直交する溝を横切るごとに段階的に変化する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。図は、隔壁自体の幅が変化する場合を示す。

【図9】図8の変形例で、隔壁の大きさは同じであるが、その数が増減する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図10】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する3本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を横切るごとに相互の位置関係を変えている場合を示す。図では、2分の1ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図11】隔壁が相対するウエルに向かう方向に繋がっている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図12】流路を介してウエルが直列に3個連通している場合を示す。

【図13】1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通している場合を示す。

【図14】1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通している場合であって、全体として円形を構成している場合を示す。

【図15】図13の装置の断面図。

【図16】1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通していると共に、それら複数のウエルの

(11)

特開2002-159287

19

20

内、2つづつが更に他の共通のウエルと流路を介して直通している場合を示す。

【図17】多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユニットの集積例を示す。

【図18】多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユニットの集積例を示す。

【図19】多数ユニットの集積例であり、異なったタイプのユニットの集積例を示す。

【図20】多数ユニットの集積例であり、円形タイプの集積例を示す。

【図21】図20の装置の断面図。

【図22】細胞走化性検出及び走化細胞分離装置の組立例を示す図であり、(1)は部品毎の斜視図、(2)は対応する断面図である。

【図23】流路に沿って壁が設けられたウエルの例を示す図である。

【図24】流路に沿って壁が設けられたウエルの他の例を示す図である。

【図25】図23のウエルが集積配置された例を示す図である。

【図26】流路1における土手8が多段式のテラス11、11'、11''を有する場合を示す。

【図27】流路及びウエルを製作する工程の一例を示す

【図28】試料注入・採取用管3の上部にビベット挿入口を設けた例を示す。

【図29】本発明に関わる細胞走化性検出又は走化細胞分離装置の自動制御機構の例を示す図である。

【図30】細胞貯蔵部における容器の例を示す図である。

【図31】検体貯蔵部における容器の例を示す図である。

【図32】検体貯蔵部における図31の容器の配置例を示す図である。

【図33】検体貯蔵部における容器の他の例を示す図である。

【図34】本発明で使用するビベットの例を示す図である。

【図35】土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで隔壁の列を2箇所に形成した例を示す。

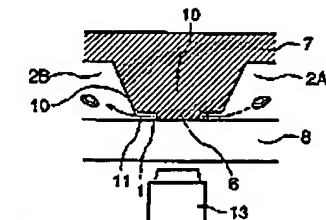
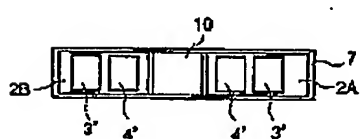
*【符号の説明】

- 1：流路
- 2：ウエル。添字のA、B、B'、Cはウエルの区別を意味する(以下同じ)。
- 3：試料注入・採取用管
- 3'：管3に対応する貫通孔
- 4：試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管
- 4'：管4に対応する貫通孔
- 5：流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝
- 6：隔壁
- 7：基板
- 8：ガラス基板
- 9：管を穿ったブロック
- 10：土手
- 11、11'、11''：テラス
- 12：溝5に直交する溝
- 13：検出器
- 14：流路に沿って設けられた壁
- 15：マニュアル操作用ビベットの先端部
- 16：パッキング
- 17：カバーキャップ
- 18：O-リング
- 19：ガイドピン受孔
- 20：ガイドピン
- 21：中間支持体
- 22：底支持体
- 23：マルチチャネルシリンジ
- 24：自動ビベットのニードル
- 25：細胞貯蔵容器
- 26：細胞注入部
- 27：液体導入部
- 28：検体貯蔵容器
- 29：ビベットニードルの導入口
- 30：ビベット洗浄部
- X-X'：検体供給ビベットの動線
- Y-Y'：細胞供給ビベットの動線

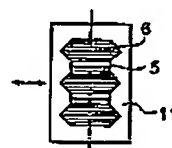
【図2】

【図3】

【図4】



6: 隔壁
11: テラス
13: 検出器

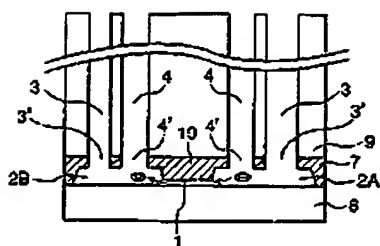


5: 流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝

(12)

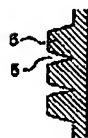
特開2002-159287

【図1】

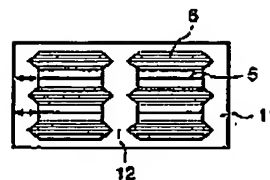


- 1: 流路
2: 管
3: 試料注入・採取用管
3': 管3に対応する貫通孔
4: 試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管
4': 管4に対応する貫通孔
5: 基板
6: 基板
7: 管を穿ったアッ
8: 土手

【図5】

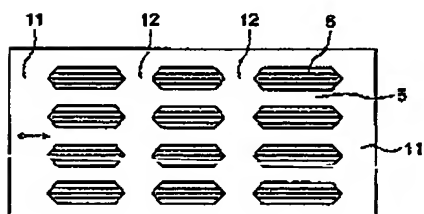


【図6】



12: 溝5に直交する溝

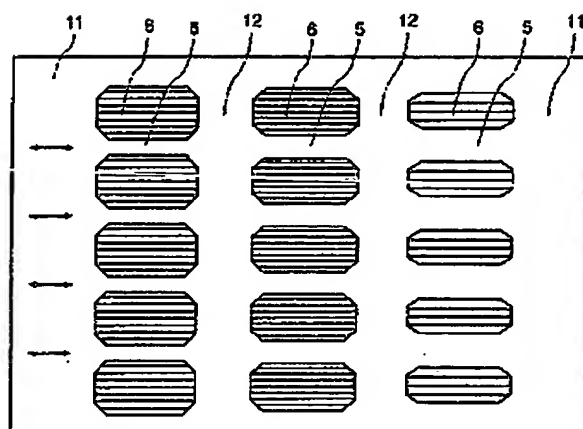
【図7】



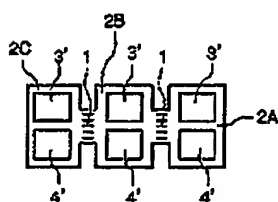
【図11】



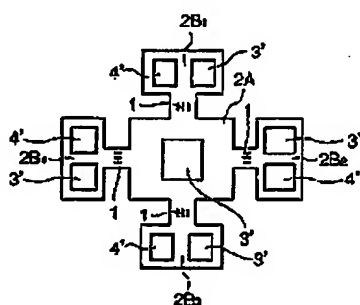
【図8】



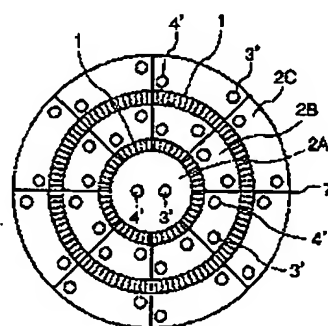
【図12】



【図13】



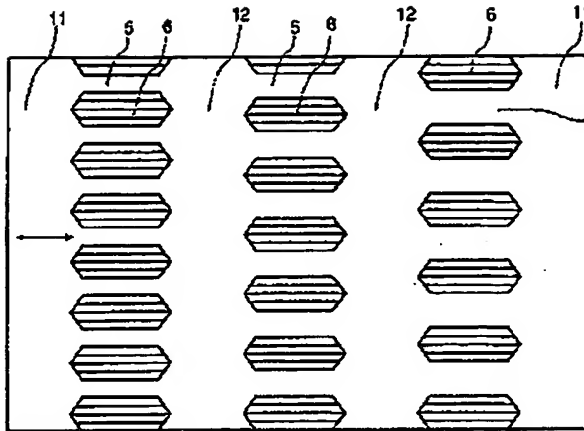
【図14】



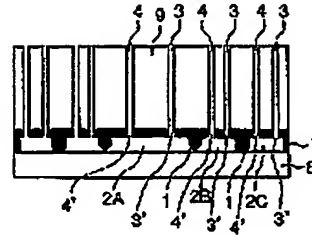
(13)

特開2002-159287

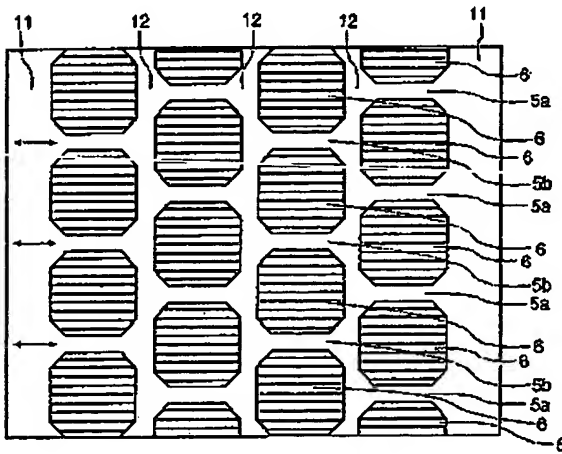
【図9】



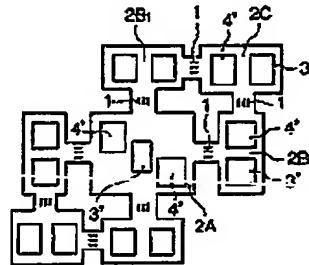
【図15】



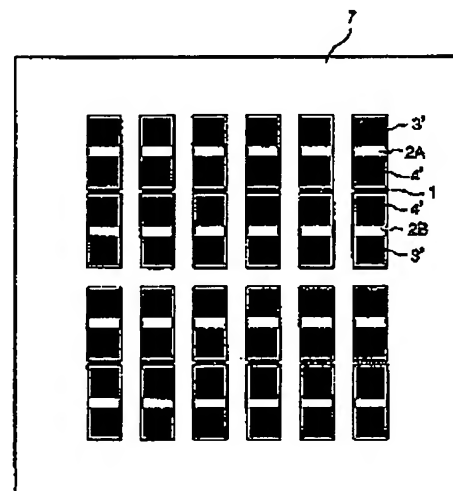
【図10】



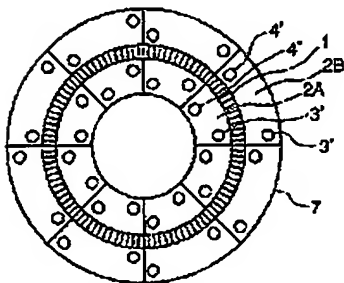
【図16】



【図17】



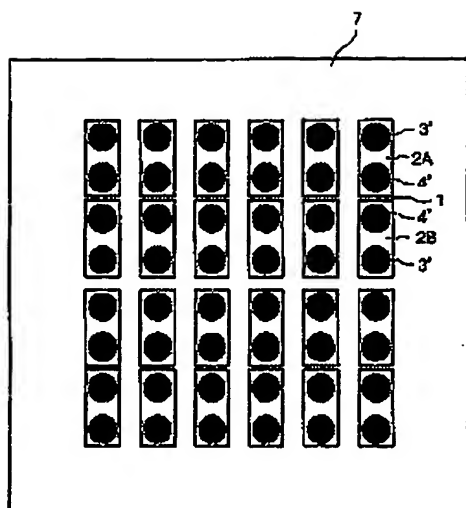
【図20】



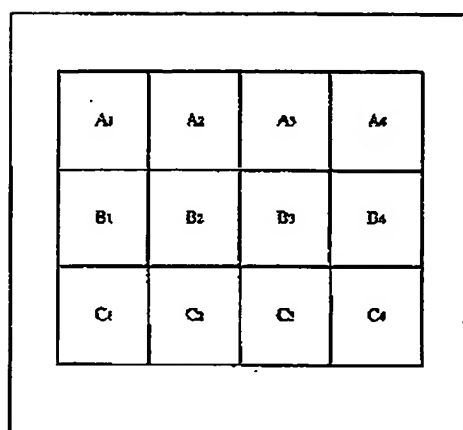
(14)

特開2002-159287

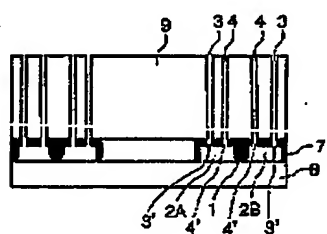
【図18】



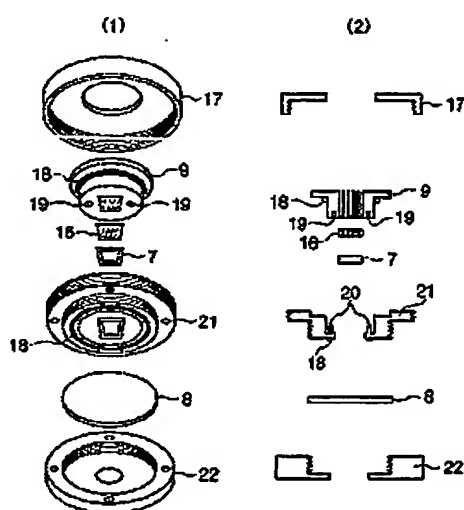
【図19】



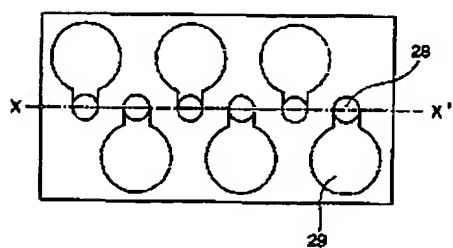
【図21】



【図22】



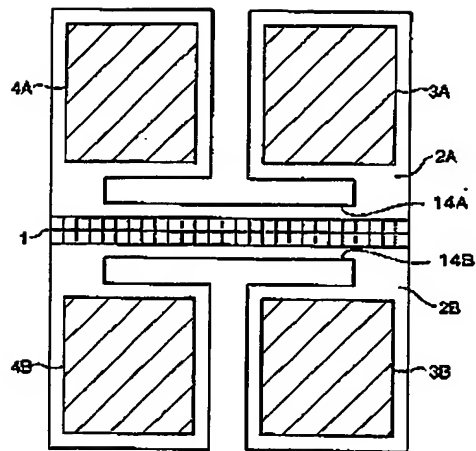
【図32】



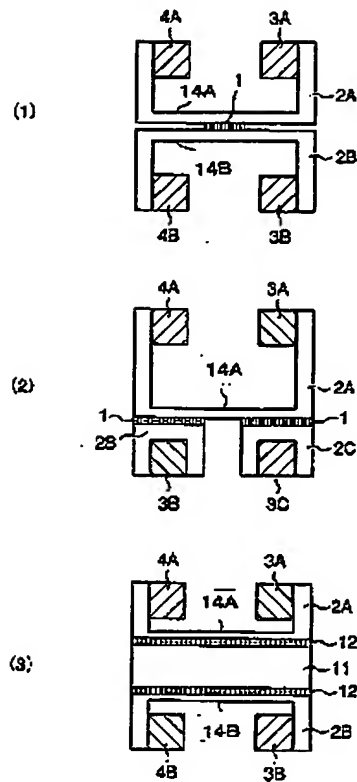
(15)

特開2002-159287

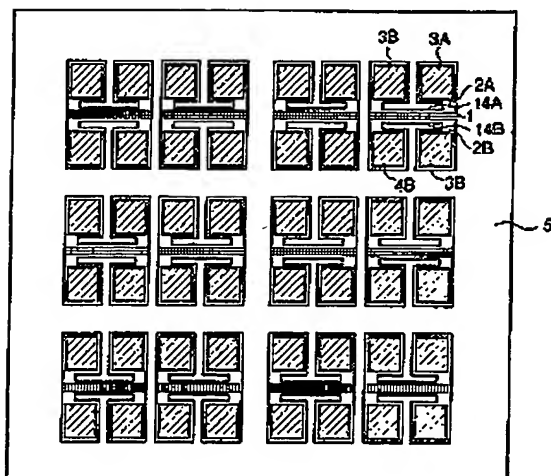
【図23】



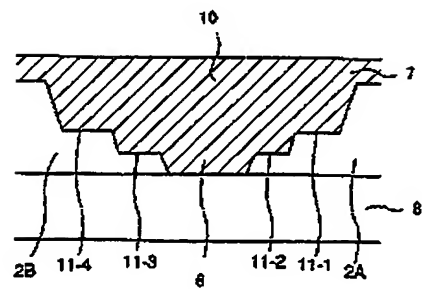
【図24】



【図25】



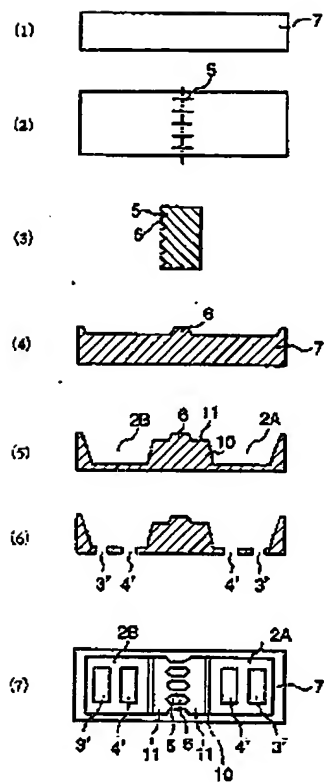
【図26】



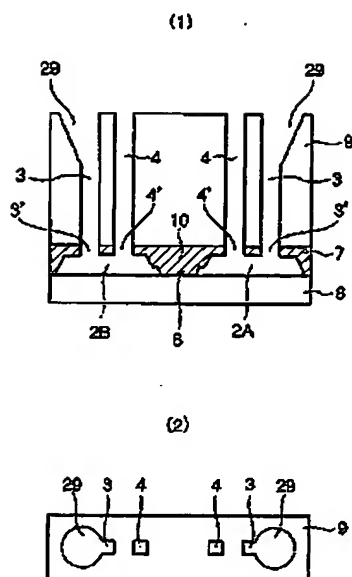
(15)

特開2002-159287

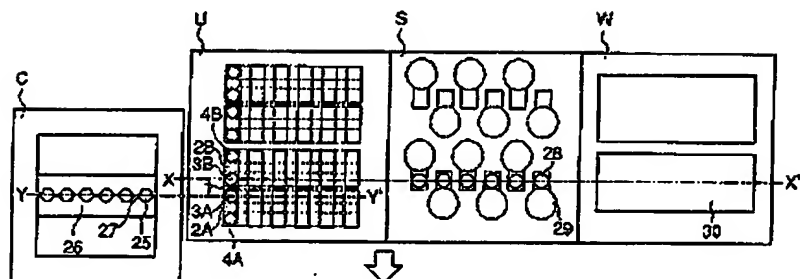
【圖27】



【圖28】



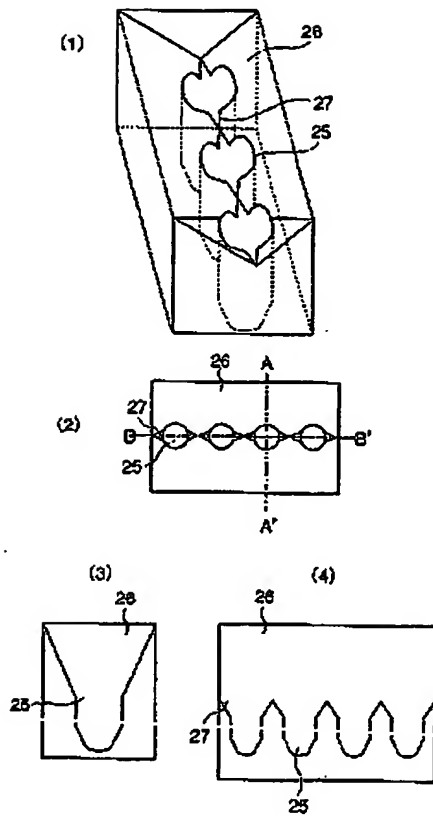
【圖29】



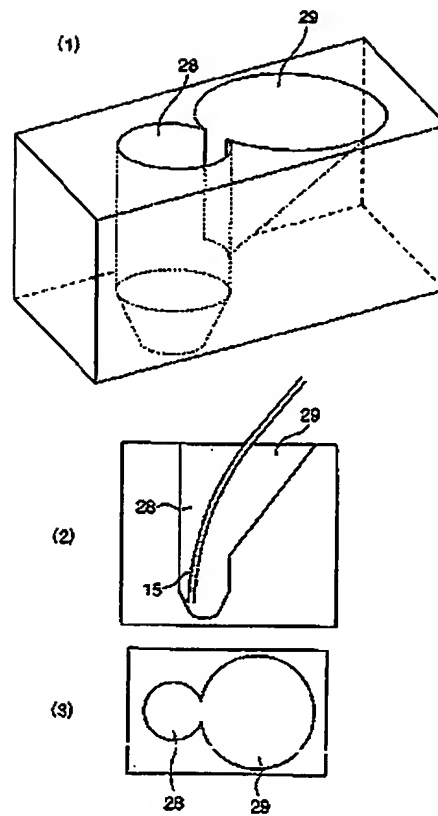
(17)

特開2002-159287

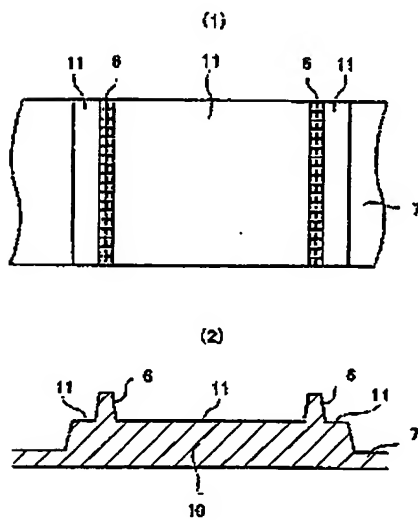
【図30】



【図31】



【図35】

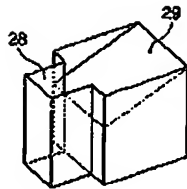


(18)

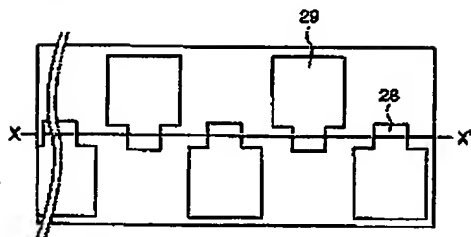
特開2002-159287

【図33】

(1)

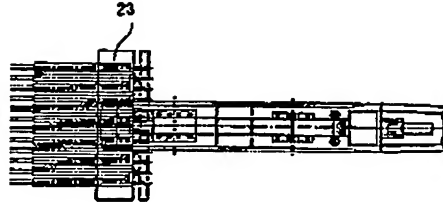


(2)

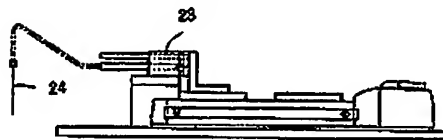


【図34】

(1)



(2)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ 識別記号
 G 0 1 N 33/48
 33/483
 // C 1 2 Q 1/06

F I
 G 0 1 N 33/483 C
 C 1 2 Q 1/06
 C 1 2 N 5/00 E

(72)発明者 菊池 裕子
 北海道小樽市桂岡町14番30

Fターム(参考) 2G045 B813 CA02 CA12 CA15 CA16
 CA17 CA25 CB01 FA08 FA16
 FA19 FB07 GC15 GC22 HA06
 JA01 JA04 JA07
 4B029 AA07 AA09 B811 CC01 FA05
 FA10 HA07 HA09
 4B053 QA01 QA05 Q003 Q008 Q020
 QR56 QS10 QS39 QX01
 4B055 AA90X AC20 BD50 CA46

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.